

بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs1518108 ژن اینترلوکین ۲۰ و احتمال ابتلاء به هپاتیت B

مزمّن

فرزانه سادات میرفخار^۱، سید مسعود حسینی^۲، سید رضا محبی^۳، پدرام عظیم زاده^۴، مهسا خوان یغما^۵، محمدرضا زالی^۶

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه ویروس شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (مؤلف مسئول) تلفن ثابت:

۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۴ sr.mohebbi@sbum.ac.ir

۴. دانشجوی دکتری تخصصی علوم سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵. کارشناسی ارشد زیست شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۷. استاد، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: نتیجه عفونت با ویروس هپاتیت B (HBV) در افراد مختلف متفاوت است. به نظر می رسد که آسیب های کبدی در عفونت مزمن هپاتیت B بیشتر به دلیل تلاش پاسخ ایمنی میزبان جهت کنترل عفونت می باشد. مطالعات مختلف شواهدی مبنی بر ارتباط بین پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی ژن های اینترلوکین و استعداد ابتلاء به بیماری های عفونی را ارائه نموده اند. هدف از این مطالعه بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (rs1518108) ژن اینترلوکین ۲۰ از نظر فراوانی ژنوتیپی و آللی و ارتباط آن با نتیجه عفونت هپاتیت B می باشد.

روش بررسی: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی موقعیت rs1518108 ژن اینترلوکین ۲۰ در افراد مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B و افراد سالم به عنوان گروه شاهد بررسی گردید. از ۱۳۴ بیمار هپاتیت B که آزمون الایزای آنها مثبت شده بود به همراه ۱۱۹ نفر شاهد سالم، نمونه خون جمع آوری شد. با استفاده از روش PCR-RFLP و مطالعه موردی - شاهدی، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی مورد نظر برای تفاوت در فراوانی آللی و ژنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: ژنوتیپ CT با درصد بالاتری در گروه افراد مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B مشاهده شد. با این حال این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/856$). فراوانی ژنوتیپی و آللی در هر ۲ گروه بررسی و مقایسه شد و تفاوت معنی داری در فراوانی پلی مورفیسم rs1518108 ژن اینترلوکین ۲۰ در بین گروه بیماران مزمن و شاهد سالم نه در سطح ژنوتیپ ($P=0/827$) و نه در سطح آللی یافت نشد ($P=0/784$).

نتیجه گیری: نتایج حاکی از عدم همبستگی بین پلی مورفیسم rs1518108 ژن اینترلوکین ۲۰ و عفونت با HBV و یا پیشرفت بیماری به سمت مزمن شدن می باشد و این که این پلی مورفیسم را نمی توان به عنوان یک عامل ژنتیکی مرتبط با نتیجه عفونت با HBV در نظر گرفت. به نظر می رسد فاکتورهای ژنتیکی دیگری غیر از اینترلوکین ۲۰ یا پلی مورفیسم های دیگر این ژن، در فرآیند پاک سازی و جلوگیری از عفونت مزمن هپاتیت B نقش دارند.

کلید واژه ها: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، اینترلوکین ۲۰، ویروس هپاتیت B

وصول مقاله: ۹۳/۶/۱۵ اصلاحیه نهایی: ۹۳/۹/۴ پذیرش: ۹۳/۱۰/۷

مقدمه

عفونت با ویروس هپاتیت B (HBV) گسترده‌گی جهانی دارد. این بیماری در بسیاری از مناطق دنیا از جمله آفریقا، جنوب شرق آسیا و چین به صورت اندمیک می‌باشد. حدود یک سوم جمعیت جهان شواهد سرولوژیکی از عفونت قبلی یا فعلی با ویروس هپاتیت B را نشان می‌دهند (۱). علی‌رغم وجود واکسن مؤثر، ۳۵۰ تا ۴۰۰ میلیون نفر در دنیا مبتلا به هپاتیت B مزمن و حامل HBsAg می‌باشند (۱-۳).

در ۵٪ از بالغین مبتلا به هپاتیت B، بیماری به سمت مزمن شدن پیش می‌رود، که می‌تواند در نهایت به سیروز کبدی و کارسینومای هپاتوسلولار منجر شود (۲ و ۱). ویروس هپاتیت B به شکل مستقیم سیتوپاتیک نمی‌باشد و آسیب‌های کبدی بیشتر به دلیل فعالیت‌های سیستم ایمنی میزبان (پاسخ ایمنی سلولی) جهت پاک‌سازی عفونت روی می‌دهد (۴). یکی از فاکتورهای مؤثر در روند پیشرفت بیماری زمینه ژنتیکی میزبان است و شامل تنوع در توالی ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی از جمله ژن‌های کدکننده سیتوکین‌ها می‌باشد که این تنوع می‌تواند بر روند بیماری، مزمن شدن آن و شدت پاسخ ایمنی اثر بگذارد (۵).

سیتوکین‌ها وظیفه تنظیم پاسخ ایمنی سلولی را بر عهده دارند و پلی مورفیسم در ناحیه ژن آنها بر میزان بیانشان مؤثر است (۶). سیتوکین‌های خانواده اینترلوکین ۱۰، فعالیت‌های متنوعی از جمله سرکوب سیستم ایمنی، ایمنی ضد باکتری، ایمنی ضد ویروسی، ایمنی ضد سرطان و افزایش تحمل خود در بیماری‌های خودایمنی دارند (۷).

اینترلوکین ۲۰ (IL-20)، که در سال‌های اخیر شناخته شده است، به خانواده بزرگ اینترلوکین ۱۰، تعلق دارد و اعضای این خانواده پاسخ‌های التهابی را کنترل می‌کنند (۸). ژن کدکننده IL-20 در ناحیه‌ای ۱۹۵ کیلو جفت بازی بر روی کروموزوم ۳۲q قرار دارد (۹). IL-20 به طور غالب توسط مونوسیت‌ها و کراتینوسیت‌های اندوتلیال بیان می‌شود (۱۰). در انسان IL-20 باعث القای IL-6، TNF α در

مونوسیت‌ها و القای بیان فاکتور رشد کراتینوسیت‌ها شده که این امر منجر به تمایز و تکثیر غیرطبیعی کراتینوسیت‌ها می‌شود، همچنین تیروزین پروتئین کیناز پروتوآنکوژن ROS در سلول‌های CD8⁺T را القا کرده و به عنوان سیتوکین پیش‌التهابی زود هنگام عمل می‌کند (۱۲ و ۱۱ و ۲). پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) متعددی در ژن کدکننده IL-20 وجود دارند. از جمله این پلی مورفیسم‌ها می‌توان به rs1518108 اشاره کرد که یک SNP اینترژنیک است و در ناحیه ۱ کیلو جفت بازی پایین دست سایت پلی‌آدنیلایسون IL-20 و در ۲۸ کیلو جفت بازی بالادست ژن IL-24 قرار دارد (۲).

با توجه به نقش IL-20 بر سیستم ایمنی سلولی و همچنین نقش پلی مورفیسم‌ها بر میزان بیان این سیتوکین، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs1518108 در مبتلایان به هپاتیت B مزمن در سطح آللی و ژنوتیپی طراحی گردید.

روش بررسی

این تحقیق یک مطالعه موردی-شاهدی (case-control) بود که در آن ۱۳۴ نفر مبتلا به هپاتیت B مزمن و ۱۱۹ فرد سالم به عنوان گروه کنترل شرکت کردند. نمونه‌ها از میان افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی تهران جمع‌آوری شدند. سپس پلی مورفیسم C/T rs1518108 ژن اینترلوکین ۲۰ در این افراد به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. از کلیه شرکت‌کنندگان در این مطالعه رضایت‌نامه اخذ و در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت در مطالعه توضیح داده شد.

استخراج DNA:

از افرادی که آزمون الایزای آنها برای بیماری هپاتیت B مزمن مثبت بود، خون دریافت شد که شامل افرادی بودند که HBsAg و Anti-HBcAb آنها به مدت بیش از شش ماه مثبت و میزان ALT آنها بالاتر از دو برابر حد

نرمال بود. افراد گروه شاهد بطور تصادفی از میان داوطلبان سالمی که آزمایش الایزای آنها برای هپاتیت B منفی بود انتخاب شدند. سپس از نمونه‌های خون برای استخراج DNA ژنومی به روش اشباع نمکی (salting out) استفاده شد (۱۳).

تعیین ژنوتیپ:

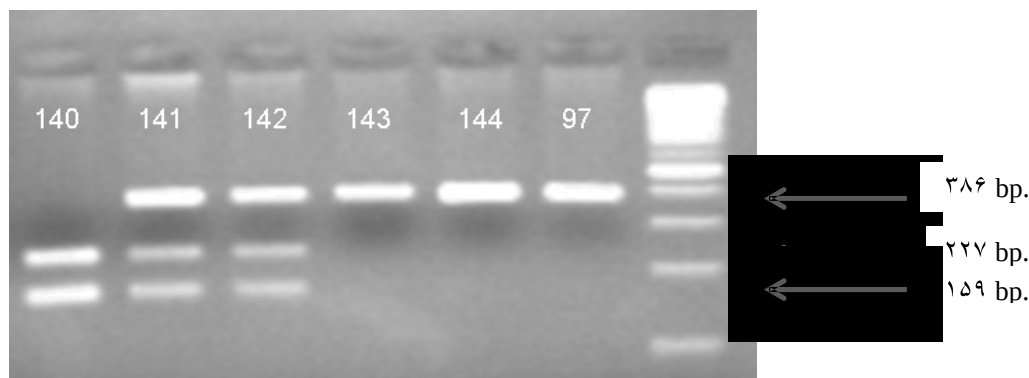
ردیابی محل پلی مرفیسم با استفاده از روش واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) صورت پذیرفت. به کمک نرم افزار Gene Runner و بخش Primer Blast سایت "NCBI" (مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری) پرایمرها طراحی شدند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (F: 5'GCCCAGACAGGTGTATGAGC 3' و

R: 5'GAGTTATCAAAAAGTTAAAGTCA 3') (TTG) قطعه‌ای از DNA ژنومی که حاوی محل SNP IL-20 بود طی PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) در شرایط زیر تکثیر شد. مقدار ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی الگو به مخلوط واکنش حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر (MgCl₂-Plus)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط حاوی ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلیمرز و ۱۰ پیکو مول از هر پرایمر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه گردید. سپس واکنش PCR طبق برنامه زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد

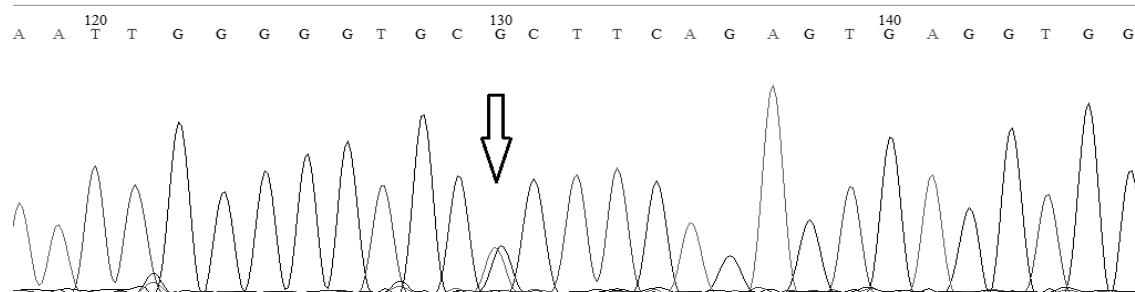
به مدت ۱۵ دقیقه به دنبال آن ۳۵ چرخه از دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد جهت تکثیر نهایی اعمال شد. محصول PCR پس از بردن روی ژل آگارز ۱٪ و مشاهده قطعه ۳۸۶ جفت بازی، توسط آنزیم محدودالتر ApaLI و طبق پروتکل شرکت سازنده به روش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت (جدول ۱). این آنزیم ناحیه بین G و T را در توالی ۳'...G[↓]TGCAC...۵' برش می‌دهد. محصول هضم آنزیمی نیز روی ژل ۳٪ آگارز برده و الکتروفورز شد. قطعه تکثیر شده PCR برای این آنزیم دارای یک جایگاه برش است. در افراد با ژنوتیپ TT دو قطعه ۱۵۹ و ۲۲۷ جفت بازی نمایان شد. در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت C یک قطعه ۳۸۶ جفت بازی برش نخورده و در هتروزیگوت CT سه قطعه ۳۸۶، ۲۲۷ و ۱۵۹ جفت بازی مشاهده گردید (تصویر ۱). در نهایت برای تأیید نتایج تعیین ژنوتیپ به روش RFLP، درصدی از نمونه‌ها به شکل تصادفی انتخاب و توالی‌یابی شدند. نتایج تعیین توالی مستقیم تأیید کننده نتایج حاصل از RFLP بود (تصویر ۲).

جدول ۱: آنزیم برش دهنده و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی.

آنزیم	دما	زمان	جایگاه شناسایی و برش	ژنوتیب	طول قطعات
ApaLI	۳۷ °C	۱۶-۲۰ ساعت	۵'...G [▼] TGCAC...۳'	CC	۳۸۶
			۳'...CACGT [▲] G...۵'	CT	۱۵۹-۲۲۷-۳۸۶
				TT	۱۵۹-۲۲۷



تصویر ۱: نمونه‌هایی از نتایج هضم آنزیمی (RFLP). در این تصویر باندهای حاصل از برش با آنزیم محدود کننده ApaLI روی ژل ۳٪ نشان داده شده است. نمونه‌ی شماره‌ی ۱۴۰ با ژنوتیپ هموزیگوت TT با طول قطعات ۲۲۷ و ۱۵۹ جفت بازی. ۱۴۱ و ۱۴۲ نمونه‌هایی با ژنوتیپ هتروزیگوت و ۱۴۳، ۱۴۴ و ۹۷، باند حاصل از محصول PCR برش نخورده به طول ۳۸۶ جفت باز. در این ژل از مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas) استفاده شده است.



تصویر ۲: نتیجه تعیین توالی مستقیم محصول PCR. قطعه‌ای از توالی ژن IL-20 حاوی جایگاه پلی مورفیسم با فلش مشخص شده. حضور ۲ آلل G و A در این ناحیه ۲ پیک روی هم ایجاد کرده است که نشان دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت در نمونه مورد آزمایش می‌باشد. برای سکانس از پرایمر معکوس استفاده شد.

روش‌های آماری

داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ افراد دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS.V19 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپی و آللی با استفاده از آزمون مربع کای و آنالیز رگرسیون لجیستیک نیز انجام گرفت.

یافته‌ها

از میان افراد شرکت کننده در این تحقیق ۶/۸٪ را مردان و ۴/۱٪ را زنان تشکیل دادند. فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف این پلی مورفیسم، CC، CT و TT در ۲ گروه به ترتیب ۳/۳٪، ۱۷/۲٪ و ۴۵/۴٪ در گروه بیماران و ۳/۳٪، ۱۸/۵٪ و ۷۸/۲٪ در گروه کنترل می‌باشد. توزیع آلل‌های C و T نیز در ۲ گروه به ترتیب ۸۲/۸٪ و ۱۷/۲٪ در بیماران و ۸۱/۵٪ و ۱۸/۵٪ در گروه کنترل می‌باشد. توزیع ژنوتیپ‌ها به تفکیک جنس در جدول ۲ ارائه شده است.

با وجود فراوانی کمتر ژنوتیپ TT در گروه بیماران، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نشد ($P=0/827$). به منظور حذف تأثیر جنسیت آنالیز رگرسیون لجیستیک انجام شد که در این حالت نیز اختلاف معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپ‌ها در دو گروه شاهد و بیمار مشاهده نگردید (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی آلل و ژنوتایپ‌های پلی مرفیسم C/T ۱۵۱۸۱۰۸ در گروه بیماران و کنترل با لحاظ جنسیت.

ژنوتایپ	هپاتیت B		شاهد		P Value	OR (CI 95%)
	مرد	زن	مرد	زن		
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		
CC	۲۶ (۳۴/۲)	۱۹ (۳۲/۸)	۱۶ (۳۴)	۲۷ (۳۷/۵)		
TC	۳۶ (۴۷/۴)	۳۰ (۵۱/۷)	۲۱ (۴۴/۷)	۳۳ (۴۵/۸)	.۵۸۱	.۸۵۶ (۱/۴۹۳-۱/۴۸۶)
TT	۱۴ (۱۸/۴)	۹ (۱۵/۵)	۱۰ (۲۱/۳)	۱۲ (۱۶/۷)	.۹۹۸	۱/۰۰۱ (۱/۴۸۸-۲/۰۵۴)
آلل						
C	۶۲ (۸۱/۶)	۴۹ (۸۴/۵)	۳۷ (۷۸/۷)	۶۰ (۸۳/۳)		
T	۱۴ (۱۸/۴)	۹ (۱۵/۵)	۱۰ (۲۱/۳)	۱۲ (۱۶/۷)	.۳۳۲	۱/۰۹۵ (۱/۵۷۴-۲/۰۸۶)

بحث

در بین افراد یک جامعه فرم‌های متنوع بالینی از عفونت هپاتیت B بروز می‌کند. فرد می‌تواند ویروس را از بدن خارج کند، بدین معنا که در ۹۵٪ از موارد عفونت با ویروس هپاتیت B در افراد بالغ، پاکسازی ویروسی در بدن به صورت خود به خودی اتفاق می‌افتد. ناتوانی در پاکسازی ویروس منجر به عفونت مزمن می‌شود (۱۴). فاکتورهای ژنتیکی و ایمنی میزبان نقش بسزایی در چگونگی بیماری‌زایی یک ویروس دارند. هر تغییر ژنتیکی می‌تواند در عملکرد عامل‌های ایمنی فرد علیه هپاتیت B اثرگذار باشد و منجر به تفاوت در شدت و کیفیت پاسخ ایمنی میزبان گردد که با نتیجه عفونت HBV مرتبط است (۱۵).

سیتوکین‌ها نقش مهمی در دفاع بدن علیه عفونت‌های ویروسی بر عهده دارند و به صورت مستقیم از طریق مهار همانندسازی ویروسی و همچنین به صورت غیرمستقیم از طریق تعیین پاسخ ایمنی مناسب این نقش را ایفا می‌کنند. در صورت بروز پاسخ التهابی علیه ویروس، سیتوکین‌ها می‌توانند باعث آسیب‌های کبدی شوند. برای شروع یک پاسخ ایمنی مؤثر در عفونت حاد، آزادسازی سیتوکین‌های تیپ ۱ اتفاق می‌افتد. سیتوکین‌های آزاد شده توسط

سلول‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ نیز در مهار تکثیر HBV نقش مهمی دارند (۹). در صورتی که پاسخ حاد مؤثر نباشد، هپاتیت B مزمن می‌شود. در این حالت پاسخ التهابی کمتر از حد مطلوب خواهد بود که در مدت زمان طولانی، عفونت مزمن به فیروز کبدی می‌انجامد. بنابراین سیتوکین‌ها نقش مهمی را در کنترل همانندسازی ویروسی و در تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارند (۱۴).

IL-20 از خانواده‌ی سیتوکین‌های IL-10 می‌باشد که فعالیت پیش‌التهابی آن به تازگی مشخص شده است (۸). میزان بیان ژن IL-20 در تنظیم سیستم ایمنی بدن در عفونت به HBV دخالت دارد و پلی‌مرفیسم در این ژن ممکن است در مزمن شدن بیماری نقش داشته باشد. با بررسی توالی‌های کدکننده IL-20 آن را در سیتوکین‌های کلاس II و به علت همولوژی بالای اسیدهای آمینه‌اش با IL-10 آن را در خانواده IL-10 قرار می‌دهند (۹ و ۱۲). به علت شباهت زیاد، اینترلوکین‌های این خانواده رستپورهای مشترک دارند (۱۶). IL-10 در اصل به عنوان یک سیتوکین ضد التهابی با فعالیت‌های تعدیل‌کنندگی پاسخ ایمنی شناخته شده است در حالی که تصور می‌شود IL-20 بیشتر فعالیتش منحصر به بافت‌ها (Tissue specific)

باشد (۱۷ و ۱۸). از آنجایی که IL-20 رسپتورهای مشترکی با دیگر سیتوکین‌های خانواده IL-10 دارد، این تصور وجود دارد که در فعالیت‌های بیولوژیکی نیز اشتراکاتی وجود داشته باشد (۱۶ و ۸).

در انسان IL-20 باعث القای IL-6 و TNF α در مونوسیت‌ها و القای بیان فاکتور رشد کراتینوسیت‌ها و القای تیروزین پروتئین کیناز پروتوانکوزن ROS در سلول‌های T CD8⁺ شده و به عنوان یک سیتوکین پیش‌التهابی زود هنگام شناخته می‌شود (۶). همچنین IL-20 مانند IL-10 به عنوان تنظیم‌کننده تعادل Th1/Th2 عمل می‌کند که در رابطه با عفونت هپاتیت B برای پاکسازی بدن از ویروس لازم است پاسخ ایمنی فرد به سمت Th1 پیشروی کند (۱۴). بیان بیش از اندازه IL-20 باعث تمایزات پوستی از جمله براق شدن و چروک خوردگی پوست در موش‌های تراپختی و باعث مرگ موش‌های تازه متولد شده می‌شود که علت مرگ، نقص در سد دفاعی پوستی می‌باشد (۸). در انسان IL-20 باعث تحریک سلول‌های ایمنی پوست شده و منجر به تکثیر و تمایز غیرطبیعی کراتینوسیت‌ها و در نهایت پسوریازیس می‌شود (۲۱-۱۹). از طرفی ظهور علائم بیماری پسوریازیس یکی از عوارض جانبی درمان با اینترفرون α در بیماران هپاتیت B مزمن گزارش شده است (۲۲).

این فرض وجود دارد که تغییرات ژنتیکی از جمله پلی مرفیسم در ناحیه ژن IL-20 می‌تواند بر بیان و عملکرد مولکول‌های آن اثر گذاشته و پاسخ ایمنی سلولی اولیه علیه آلودگی ویروسی را تحت تأثیر قرار دهد. با این حال یافته‌های این مطالعه که تا امروز اولین بررسی گزارش شده در ایران می‌باشد، بیانگر عدم همبستگی پلی مرفیسم rs1518108 با خطر ابتلا به عفونت مزمن هپاتیت B در جمعیت مورد مطالعه بود.

در ارتباط با این پلی مرفیسم بطور کلی پژوهش‌های بسیار اندکی صورت گرفته است. تنها مطالعه مشابه که به ارتباط این پلی مرفیسم و هپاتیت B پرداخته است در آمریکا توسط

Truelove و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی دو جمعیت سفیدپوستان و سیاه‌پوستان آمریکا (آفریقایی تبارهای آمریکائی) انجام گرفته است. در جمعیت سیاه‌پوستان آمریکا بین واریانت‌های این SNP و بیماران هپاتیت B ارتباط معنی‌داری مشاهده شد، در حالیکه این اختلاف در جمعیت سفیدپوستان آمریکا معنی‌دار نگردید. فراوانی آلل T در جمعیت سفیدپوستان آمریکا در هر ۲ گروه بیمار و شاهد ۶۹٪ گزارش شد که با ۱۸٪ حاصل از نتایج مطالعه ما همخوانی نداشت. طبق یافته آنان در جمعیت سیاه‌پوستان آمریکا هتروزیگوت‌ها در پلی مرفیسم rs1518108 به عفونت HBV حساس ترند (۲).

مطالعات اندکی نیز بر دیگر بیماری‌های عفونی وابسته به ایمنی سلولی و ارتباط آنها با پلی مرفیسم‌های IL-20 انجام شده است. مثلاً در مطالعه مشابهی که توسط Yamamoto در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت، نقش پلی مرفیسم‌های ژن IL-20 در بیماران کولیت اولسراتیو (Ulcerative Colitis) در جمعیت مکزیکی بررسی گردید. طبق نتایج این مطالعه کاهش معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپی پلی مرفیسم rs1815108 ژن IL-20 در دو گروه بیماران کولیت اولسراتیو و کنترل مشاهده گشت (۲۳). در پژوهش دیگری نقش کترلی IL-20 در فرآیند بیماری‌زایی آرتریت روماتوئید (Rheumatoid Arthritis) گزارش شد. بیماران روماتوئید میزان بیشتری IL-20 در Synovial Fluid بیان می‌کنند (۲۵ و ۲۴). در سال ۲۰۱۱ Ermers و همکاران پلی مرفیسم‌های تک نوکلئوتیدی سیتوکین‌های خانواده IL-10 از جمله IL-20 را برای بررسی ارتباط با Recurrent Wheeze After Respiratory Syncytial Virus Bronchitis مطالعه کردند. نتایج بیانگر ارتباط تفاوت‌های ژنتیکی IL-20 با بیماری مجاری تنفسی در کودکان بود (۲۵). در سال ۲۰۱۳، Kordi و همکاران ارتباط معنی‌داری بین پلی مرفیسم‌های ژن IL-20 و پیشرفت بیماری vesicoureteral reflux گزارش کردند (۲۶). در مطالعه Oleksyk ارتباط واریانت‌های

باشد. از طرفی در این قبیل مطالعات که به بررسی ارتباط ژنتیکی با یک بیماری پرداخته می‌شود، فاکتورهای متعددی می‌توانند بر نتایج مطالعه اثر گذاشته که از آن دست می‌توان به فاکتورهای اپیدمیولوژیکی و جغرافیایی و همچنین پیش زمینه‌های محیطی افراد شرکت کننده در مطالعه اشاره کرد، از جمله مصرف دخانیات یا کاهش شاخص توده بدنی، که تصور می‌شود بر میزان بیان IL-20 و در نتیجه احتمال پیشروی عفونت هپاتیت B اثر گذار باشند. از آنجا که عفونت با ویروس هپاتیت B یک بیماری چندعاملی به حساب می‌آید بررسی ارتباط یک SNP واحد نمی‌تواند اطلاعات زیادی در اختیار ما قرار دهد. لذا آنالیزهای هاپلوتیپی در چنین مواردی پیشنهاد می‌شود.

همان گونه که پیشتر ذکر شد، ژن IL-20 واجد جایگاه‌های متعدد پلی‌مرفیسم می‌باشد و فراوانی هر پلی‌مرفیسم در جمعیت‌ها و اقوام مختلف متفاوت است. پیشنهاد می‌شود جهت حصول نتایج دقیق‌تر، بررسی‌های گسترده‌تری با تعداد نمونه‌های بیشتر و در گروه‌های جمعیتی متفاوت و همچنین بر روی پلی‌مرفیسم‌های دیگر این ژن صورت گیرد. درک بهتر فرآیندهای ایمونولوژیکی و فاکتورهای ژنتیکی تاثیرگذار بر پاسخ‌های ایمنی از جمله پلی‌مرفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی می‌توانند در پیش‌آگهی از هپاتیت B، پیش‌گیری از عوارض و درمان مؤثرتر آن نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های بعمل آمده نشان داد که همبستگی بین پلی‌مرفیسم rs1518108 ژن اینترلوکین ۲۰ و عفونت با HBV وجود ندارد و همچنین این پلی‌مرفیسم در پیشرفت بیماری به سمت مزمن شدن نیز نقشی ایفا نمی‌نماید و بنابراین نمی‌توان از آن به عنوان یک فاکتور ژنتیکی مرتبط با نتیجه عفونت HBV استفاده نمود.

IL-20 با بهبودی هپاتیت C در جمعیت آفریقایی تبارهای آمریکا بررسی شد (۲۷). Traks و همکاران در سال ۲۰۰۸ ارتباط هاپلوتیپی اینترلوکین‌های خانواده IL-10 را با Disorder Major Depressive گزارش کردند در حالیکه ارتباط هیچیک از ژنوتیپ‌ها به صورت جداگانه معنی‌دار نبودند (۲۸). در مطالعه Maorino در سال ۲۰۰۹ ارتباط IL-20 و چاقی در زنان بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده، با در نظر گرفتن این موضوع که افزایش وزن یا چاقی به عنوان یک حالت پیش‌التهابی تلقی می‌شود میزان IL-20 در زنان چاق بیشتر بود و با کاهش وزن میزان آن نیز کاهش یافته بود (۲۹). همچنین مطالعات گسترده‌ای بر روی ارتباط IL-20 و التهابات پوستی و بیماری‌های پسوریازیس صورت گرفته است که بیانگر وجود چنین ارتباطی است (۳۰-۳۳ و ۲۱-۱۹). ژنوتیپ CT این پلی‌مرفیسم با کاهش حساسیت به پسوریازیس در جمعیت استونی مرتبط است.

در مطالعه حاضر توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مرفیسم rs1518108 ژن IL-20 در ۲ گروه شاهد و بیمار مقایسه گردید. نتایج نشانگر فراوانی بیشتر ژنوتیپ CT در مبتلایان به هپاتیت B بود، که این موضوع با یافته‌های برخی از بررسی‌های پیشین هم‌راستا می‌باشد. مطالعه دیگری نیز در جمعیت ایران در زمینه بررسی ارتباط این پلی‌مرفیسم با بیماری هپاتیت C توسط اربابی و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت. در این مطالعه احتمال ابتلای عفونت هپاتیت C در افراد با ژنوتیپ هتروزیگوت CT تقریباً ۲ برابر بیشتر از افراد با ژنوتیپ CC گزارش شد (۳۴). همچنین فراوانی آلل T در ۲ گروه شاهد و بیمار به ترتیب ۴/۰٪ و ۵/۵٪ اعلام شد و این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار گردید که در مقایسه با یافته‌های مطالعه حاضر مغایرت وجود دارد.

ناهمخوانی در نتایج بررسی‌های متفاوت در چنین مطالعاتی می‌تواند به علت اثرگذاری دیگر ژن‌ها یا دیگر پلی‌مرفیسم‌های ژن IL-20 بر پیشرفت بیماری هپاتیت B

تشکر و قدردانی

جباریان برای همکاری ایشان در نمونه گیری و جمع آوری

داده ها، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

نویسندگان بر خود لازم میدانند از همکاران محترم مرکز

تحقیقات گوارش و کبد، به ویژه آقایان یاسین حاتمی و

مهدی طلوعی مقدم و خانمها مریم متانی بورخیلی و فرحناز

Reference

1. Liver Eafstot. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2012;57:167-85.
2. Truelove AL, Oleksyk TK, Shrestha S, Thio CL, Goedert JJ, Donfield SM, et al. Evaluation of IL10, IL19 and IL20 gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection outcome. *International Journal of Immunogenetics* 2008;35:255-64.
3. Mohebbi SR, Sanati A, Cheraghipour K, Nejad MR, Shalmani HM, Zali MR. Hepatitis C and hepatitis B virus infection: epidemiology and risk factors in a large cohort of pregnant women in Lorestan, West of Iran. *Hepatitis Monthly* 2011;11:736-39.
4. Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* 2012;61:i6-i17.
5. Azimzadeh P, Romani S, Mirtalebi H, Reza Fatemi S, Kazemian S, Khanyaghma M, et al. Association of co-stimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86) gene polymorphism with colorectal cancer risk. *Gastroenterology & Hepatology from Bed to Bench* 2013;6: 86-91.
6. Oral HB, Kotenko SV, Yilmaz M, Mani O, Zumkehr J, Blaser K, et al. Regulation of T cells and cytokines by the interleukin-10 (IL-10)-family cytokines IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *European Journal of Immunology* 2006;36:380-8.
7. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology* 2011;29:71-109.
8. Blumberg H, Conklin D, Xu W, Grossmann A, Brender T, Carollo S, et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001;104:9-19.
9. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010;21:315-24.
10. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008;121:1108-11.
11. Chiu YS, Wei CC, Lin YJ, Hsu YH, Chang MS. IL-20 and IL-20R1 antibodies protect against liver fibrosis. *Hepatology*. 2014; 60:1003-14.
12. Fickenscher H, H?r S, Küpers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunology* 2002;23:89-96.
13. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988;16:1215.
14. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Seminars in liver disease*; 1999;19:157-69.
15. Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, et al. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *The American Journal of Gastroenterology* 2002;97:2086-92.
16. Wegenka UM. IL-20: biological functions mediated through two types of receptor complexes. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010;21:353-63.
17. Rich BE, Kupper TS. Cytokines: IL-20—a new effector in skin inflammation. *Curr Biol* 2001;11:R531-R4.
18. Kudo H, Jinnin M, Asano Y, Trojanowska M, Nakayama W, Inoue K, et al. Decreased IL-20 expression in scleroderma skin contributes to cutaneous fibrosis. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66:1636-47.

19. Kingo K, Koks S, Nikopensius T, Silm H, Vasar E. Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes and Immunity* 2004;5:117-21.
20. Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *The Journal of Immunology* 2007;178:2229-40.
21. Koks S, Kingo K, R?tsep R, Karelson M, Silm H, Vasar E. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and-20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes and Immunity* 2004;5:62-67.
22. Se?kin D, Durusoy C, ?ahin S. Concomitant vitiligo and psoriasis in a patient treated with interferon alfa-2a for chronic hepatitis B infection. *Pediatric Dermatology* 2004;21:577-9.
23. Yamamoto-Furusho JK, De-Le?n-Rend?n JL, de la Torre MG ,Alvarez-Le?n E, Vargas-Alarc?n G. Genetic polymorphisms of interleukin 20 (IL-20) in patients with ulcerative colitis. *Immunology Letters* 2013;149:50-3.
24. Hsu YH, Li HH, Hsieh MY, Liu MF, Huang KY, Chin LS, et al. Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2006;54:2722-33.
25. Ermers MJ, Janssen R, Onland-Moret NC, Hodemaekers HM, Rovers MM, Houben ML, et al. IL-10 family member genes IL-19 and IL-20 are associated with recurrent wheeze after respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatric Research* 2011;70:518-23.
26. Kordi-Tamandani DM, Sadeghi-Bojd S, Torkamanzehi A. IL-19 and IL-20 genes polymorphisms and haplotype analysis in a vesicoureteral reflux population. *Human Immunology* 2013;74:131-4.
27. Oleksyk T, Thio C, Truelove A, Goedert J, Donfield S, Kirk G, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL-10 region associated with HCV clearance. *Genes and Immunity* 2005;6:347-357.
28. Traks T, Koido K, Eller T, Maron E, Kingo K, Vasar V, et al. Polymorphisms in the interleukin-10 gene cluster are possibly involved in the increased risk for major depressive disorder. *BMC Medical Genetics* 2008;9:111.
29. Maiorino MI, Schisano B, Di Palo C, Vietri MT, Cioffi M, Giugliano G, et al. Interleukin-20 circulating levels in obese women: effect of weight loss. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2010;20:180-5.
30. Koks S, Kingo K, Vabrit K, R?tsep R, Karelson M, Silm H, et al. Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes and Immunity* 2005;6:407-15.
31. Otkjaer K, Kragballe K, Funding AT, Clausen J, Noerby P, Steiniche T, et al. The dynamics of gene expression of interleukin-19 and interleukin-20 and their receptors in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 2005;153:911-8.
32. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggle K, Anderson M, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not. *Journal of Molecular Medicine* 2009;87:523-36.
33. Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, Witte K, Philipp S, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *European Journal of Immunology* 2009;39:3570-81.
34. Arbabi-Aval E, Mohebbi SR, Rostami F, Habibi M, Vahedi M, Almasi S, et al. Study of association between interleukin 20 polymorphism (rs1518108) and chronic hepatitis C infection. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2013;15:35-8.